海藻多糖通过下调肝癌细胞 Hep3B 糖酵解途经抑制细胞增殖和迁移

冯源[1] 唐云 徐蕾

(广东省高校功能蛋白质研究重点实验室 暨南大学生命与健康工程研究院 广州 510632)

摘要 **目的：**探讨海藻多糖（Algal Polysaccharides，AP）对肝癌细胞 Hep3B 的增殖和迁移的影响及其可能的作用机制，为治疗肝癌提供新的思路。**方法：**1）比较正常细胞与癌细胞中糖酵解途经（Embden-Meyerhof-Parnas，EMP）的表达差异，用紫外分光光度计比色法检测 EMP 限速酶酶活力：已糖激酶（Hexokinase， HK），丙酮酸激酶（Pyruvate kinase， PK），用乳酸测定试剂盒测定 EMP 产物：乳酸；2）AP 处理 Hep3B 后，检测 EMP 表达水平变化；3）AP 处理细胞后，检测肝癌细胞 Hep3B 细细胞的增殖和迁移能力及上皮细胞-间充质转化（EMT）的影响，方法包括 MTT、qPCR 和 Transwell 小室实验；4）MTT、Transwell 和 qPCR 检测 HK 抑制剂 3-溴丙酮酸（3-Bromopyruvate，3-BrPA）对肝癌 Hep3B 细胞的活力和迁移能力及 EMT 的影响；5）Western Blot 和相关试剂盒检测海藻多糖与 3-BrPA 分别处理细胞时，对 EMP 水平以及 Akt 通路的影响；6）AP 联合 3-BrPA 处理 HepB3 后，检测 HK 和 Akt 信号通路表达水平及细胞活力和迁移的变化。结果：1) 癌细胞（Hep3B，Hela，SW480）EMP 代谢水平均高于正常肝细胞（HL02），其中 Hep3B 差异最为显著；2) AP 能抑制 Hep B 细胞 EMP 代谢水平，且抑制程度随着 AP 浓度升高而升高，存在浓度依赖性；3) AP 可抑制肝癌 Hep3 B 细胞的增殖和迁移，且抑制 EMT 的发生。AP 浓度为 200 mg/ mL，处理时间为 48 h 时，生长抑制率达（55±2.8）%，细胞迁移数为对照组的（32±2.9）%；4) 3-BrPA 可下调 Hep3B 细胞 HK 活性，并抑制细胞活力与迁移，且抑制 EMT 的发生。200 μmol/ L3-BrPA 作用细胞 48 h 后，与对照组相比，细胞活性下降了（52±5.8）%（ $p<0.001$），细胞迁移数下降了（48±6.1）%（ p<[0.01]）; 5) 海藻多糖和 3-BrPA 均下调糖酵解代谢水平，且抑制 Akt 信号通路; 6) AP 与 3-BrPA 联合处理 Hep3B 后，HK 表达下降，显著抑制 Akt 信号通路，细胞活性和迁移能力均较海藻糖单用组显著下降（$p<0.05$）。**结论：**肝癌 Hep3 B 细胞 EMP 代谢水平高于正常肝细胞，海藻多糖可下调 Hep3B 细胞 EMP 代谢水平，低 EMP 代谢水平可能通过下调 EMT 和 Akt 信号通路抑制 Hep3B 的增殖和迁移。当 AP 和 3- BrPA 联合应用时，抑制肝癌迁移和增殖效果更明显。

关键词 海藻多糖 EMP 途径 Hep3B 细胞 细胞增殖 细胞迁移

海藻多糖是从海藻中提取的一种高分子碳水化合物，具有丰富的生物活性。它的结构是由多个单糖基通过糖苷键相连而成的，糖基可相同或者不同[1]。海藻多糖是多糖的一种，其极端的生存环境让它成为治疗癌症的优化选择。目前来说，海藻糖抗肿瘤机制普遍认为有：使肿瘤细胞膜特性改变、诱导肿瘤细胞凋亡，通过提高抑癌基因 p53 表达、改变细胞形态从而使细胞间通讯恢复和加强抵御细胞抗自由基的能力[2]。但与糖酵解途经是否参与调节肿瘤细胞活动尚不明确。因此，

1 通讯作者，电子邮箱：fy75000@hotmail.com
收稿日期：2017-04-06
修回日期：2017-05-30

本文以肝癌细胞为主要研究对象，探讨海藻多糖对其增殖和迁移的影响及其与EMP途经的关系。为海藻多糖抗肿瘤机制的进一步研究提供新的思路。

肿瘤细胞与大多数正常的组织不同，主要通过糖酵解获取能量，甚至在供氧充足时形成对“有氧糖酵解”的依赖，即“Warburg效应”[3]。糖酵解的三个限速酶分别已糖激酶（HK），6-磷酸果糖激酶-1（PFK-10），丙酮酸激酶（PK），糖酵解终产物是乳酸。而正常组织获取能量的方式是糖的有氧氧化，仅在缺氧情况下进行糖酵解[4]。目前已发现在胰腺癌、肺癌、食管癌、宫颈癌和前列腺组织癌等癌症[5]中，EMP代谢水平高于正常组织，肿瘤同时也是一种代谢疾病的观念得到广泛认同[6]。

肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）全世界最常见的恶性肿瘤之一，在肿瘤相关死亡中排第3，其中全世界55%的患者来自中国[7]。随着科技进步，免疫疗法、基因疗法和分子靶向治疗等生物治疗已成为继传统治疗肿瘤的新型疗[8]。治疗恶性肿瘤最大的障碍来源于其侵袭和迁移的能力，肝癌细胞治疗临床肿瘤患者（90%）死亡的原因源于此[9]。目前临床缺乏有效抗肝癌增殖和迁移的药物，研制抗增殖迁移药物已成为肿瘤化疗亟待解决的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 1.1.1 细胞 HL02人正常肝细胞株，Hep3B人肝癌细胞株，Hela宫颈癌细胞株，SW620结肠癌细胞株均购自美国模式培养物集存库（American Type Culture Collection， ATCC）。

1.1.2 主要试剂 1640培养基，胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）均购自Gibco；海藻多糖由天津科技大学赠予；HK，PK酶活测定试剂和3-BrPA均购自Sigma；MTT和DMSO均购自Sigma；反转录试剂盒、BCA试剂盒、TRIzol试剂和IP细胞裂解液购自凯基生物：抗GAPDH抗体，抗HK-II抗体，抗p-AKT抗体，抗Akt抗体均购自CST；乳酸化学法分析试剂盒购自Pierce；实时荧光定量PCR Mix购自TOYOBO；蛋白转膜设备和紫外分光光度计均购自Bio-Rad。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

1.2.1 细胞培养 HL02，Hep3B，Hela，SW480均为贴壁生长，复苏后将细胞平铺在细胞培养瓶中，培养基为含10% FBS的RPMI 1640完全培养基，轻轻铺平后放入培养箱，使细胞贴壁生长，培养箱参数为37℃恒温，5%二氧化碳饱和。传代频率3天一次， 选用生长状态佳的细胞进行试验。

1.2.2 实验分组 按上述方法培养细胞后。取第3~8代细胞进行试验。当细胞密度达80%~90%时，将RPMI 1640完全培养基更换为RPMI 1640无血清培养继续培养24 h，使细胞同步化后再进行海藻糖或3-BrPA干预实验。实验分组分为6组，分别为对照组（不做任何干预）和不同终浓度海藻糖浓度剂量组[加入不同海藻糖浓度（10、20、50、100、200 mg/ mL）]培养24/48/72 h后，进行下一步实验。

1.2.3 总蛋白量测定 裂解液裂解细胞后，低温4°C，12000rpm离心30min，取上清液中的总蛋白绘制标准曲线。将细胞裂解后的上清依次稀释，使其蛋白浓度在标准曲线可信区间。

1.2.4 MTT测定细胞生长抑制率和细胞活性 取对数生长期细胞接种于96孔板，每孔4000细胞数。12h后，细胞贴壁生长，加入新鲜完全培养基和不同浓度的海

藻多糖，分为五个处理组（终浓度为 10mg/mL、20 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL 和 200mg/mL ）。另有不给海藻糖作为对照组，无细胞作为空白组。作用 48h 后，用 MTT 法在自动酶标仪上测定 490nm 吸光度。细胞生长抑制率（%）定义为：（对照组 OD 值—处理组 OD 值）/（对照组 OD 值—空白组 OD 值）*100%；细胞活力（%）定义为：（处理组 OD 值—空白组 OD 值）/（对照组 OD 值—空白组 OD 值）。

1.2.5 Western Blot 测定细胞总蛋白浓度后，根据实验设计使用 Loading Buffer 制样加样。100 V 电泳 1.5 h 后停止。100 V，200 mA 电转膜 1-2 h，将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中孵育 1 h 后加一抗，与摇床上 4℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。加二抗，于摇床上室温孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min。用显影液显影，应用凝胶成像系统拍摄，对所得图像进行灰度值分析，以 GAPDH 为内参照。用 Image J 软件定量分析。

1.2.6 酶活性测定 HK、PK 活性测定用酶耦连比色法，具体操作遵循试剂盒说明书。加入酶提取液启动反应，酶活测定在 25℃恒温下进行，在 1 cm 宽的石英比色皿中用分光光度计于 340 nm 下隔 5 s 读取吸光值（B），共读取 3 min。以 B 对时间作图，取反应最初线性部分斜率计算酶活。

1.2.7 乳酸含量测定 乳酸测定用化学比色法，具体操作遵循试剂盒说明书。

1.2.8 Transwell 法检测细胞侵袭能力 用胰酶消化对数期细胞后，制成为 $1*10^9$/L 细胞悬液。将 100μL 细胞悬液加入 Transwell 小室上层中，下室加入 400μL 完全培养基，每组设置三个平行复孔。于培养箱中培养 48 h 后取出 Transwell 小室，用棉签轻轻擦去上室未穿透的细胞，冰预冷 PBS 缓冲液轻洗 3 次，4%多聚甲醛室温固定 10 min，0.1%结晶紫染色 30 min，在显微镜下随机选取 5 个视野计数穿膜细胞数目，取平均值，放大倍数为 100 倍。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 细胞的总 RNA 使用 Trizol 提取后测浓度，取其中 1μg 反转录成 cDNA 为模板进行 qPCR，检测肝癌 Hep3 B 加入不同浓度海藻糖后，对细胞内 EMT 信号通路中 Marker mRNA 表达水平进行检测。PCR 反应条件为：94°C 预变性 3 min;94°C 变性 40s,55°C 退火 40s,72°C 延伸 40s;40 个循环;最后,65°C 5s,每次升高 0.5°C,直至 95°C。 BioRad 软件进行分析。

1.2.10 划痕修复实验 对数期细胞在 12 孔板中培养，第二天用 10ul 枪头沿直线在孔低划线，PBS 清洗两次，加入含相应浓度海藻多糖和 3-BrPA 和 2.5%FBS 的新鲜培养基培养，在倒置显微镜下拍照（×100），在划痕边缘等距离取距离培养，培养 24h 后，再拍照在同样的位置取距离。划痕修复率（%）=（0h 划痕宽度—24h 划痕宽度）/0h 划痕宽度×100%。

1.2.11 统计学方法 实验均独立重复三次，实验数据用均数±标准差标示；利用 SPSS17.0 和 GraphPad Prism5 软件进行统计学分析；多组间均数比采用 T test，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 癌细胞糖酵解（EMP）表达水平高于正常细胞

选用正常人肝细胞 HL02、肝癌细胞 Hep3B、宫颈癌细胞 Hela 和结肠癌细胞 SW480 进行实验。用分光光度计测定细胞内 HK 和 PK 酶活性，标准曲线如图 2（a）。HK 和 PK 分别是 EMP 途径的第一和第三个限速酶，测定酶活活性分别如图 2（b）和图 2（c）。癌细胞 HK 和 PK 活性均高于正常细胞 HL02，差异具有统计学意义（$p<0.05$）。乳酸是 EMP 途径产物，在癌细胞中含量均高于 HL02（$p<0.05$），见图 2（d）。肝癌细胞 Hep3B 差异最显著，故选为后续实验细胞株。

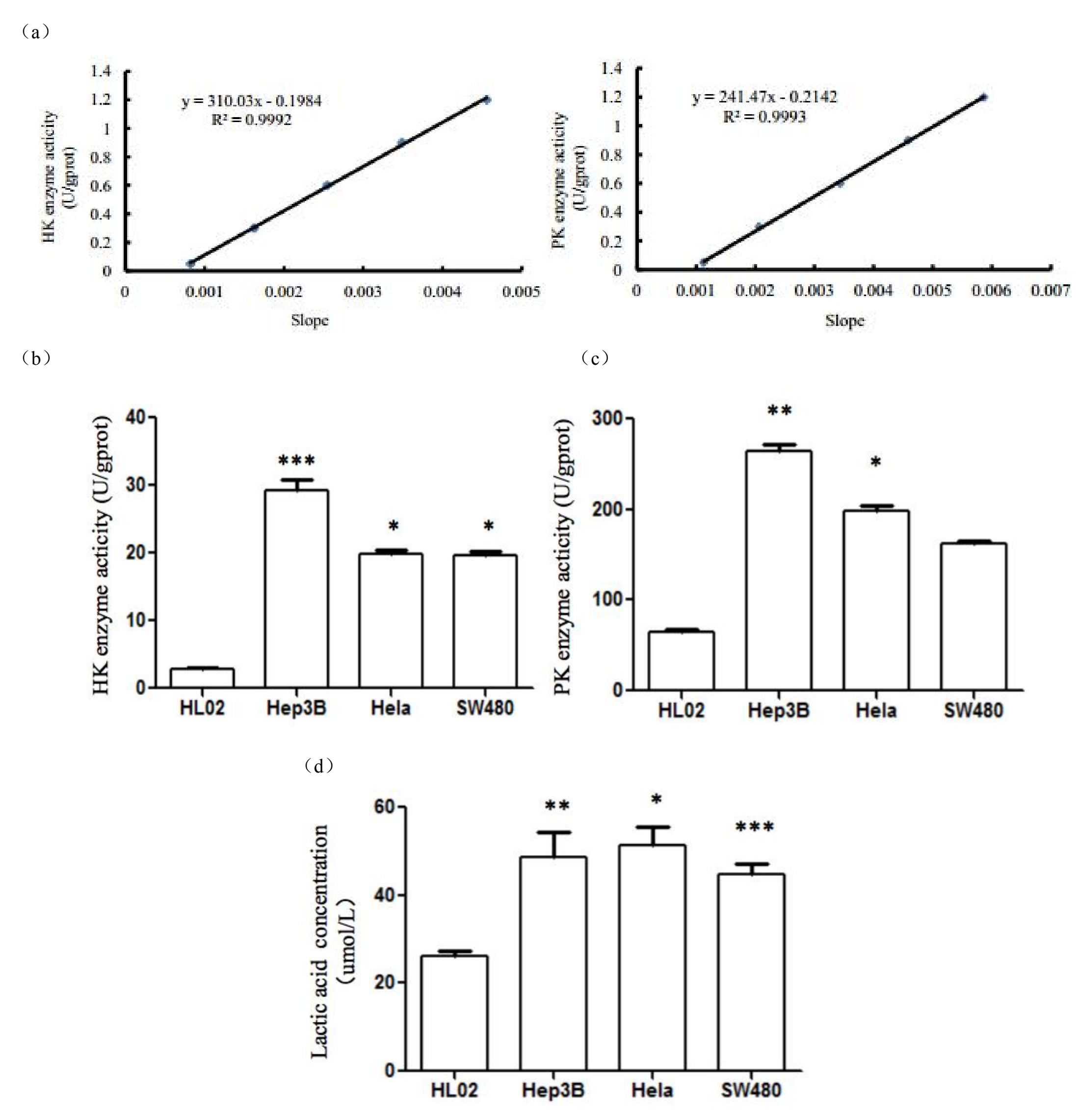


图 1 四株细胞内源性 HK 活性、PK 活性和乳酸含量测定比较

Fig.1 The endogenous enzyme activity of HK , PK and concentration of Lactic Acid in four different cell lines

(a):The standard curve of HK and PK enzyme activity. (b): The HK enzyme activity measured by UV spectrophotometer. (c). The PK enzyme activity measured by UV spectrophotometer. (d). The Lactic concentration measured by assay kit. Mean±SD. n=3.*p<0.05 vs HL02；**p<0.01 vs HL02；***p<0.001 vs HL02.

2.2 海藻多糖能抑制 Hep3B 的 EMP 代谢水平

AP 不同浓度处理 Hep3B 细胞 48h 后收细胞，测定 HK 酶活力，PK 酶活力和乳酸含量。结果表明，AP 浓度为（10-100 mg/mL）时，HK 和 PK 酶活力随着 AP 浓度升高而降低。在 AP 浓度为 100 mg/mL 时，HK 和 PK 酶活力与对照组相比，分别降低了（74±3.9）%和（76±8.9）%，差异具有统计学意义（p<0.01，p<0.001），结果见图 2（a）和图（b）。AP 浓度为（10-200 mg/mL）时，细胞内乳酸含量随着 AP 浓度升高而降低。在 AP 浓度为 200 mg/mL 时，乳酸浓度为（36±4.2）μ mol/L，比对照组降低了（60±5.8）%，差异具有统计学意义（p<0.01）。

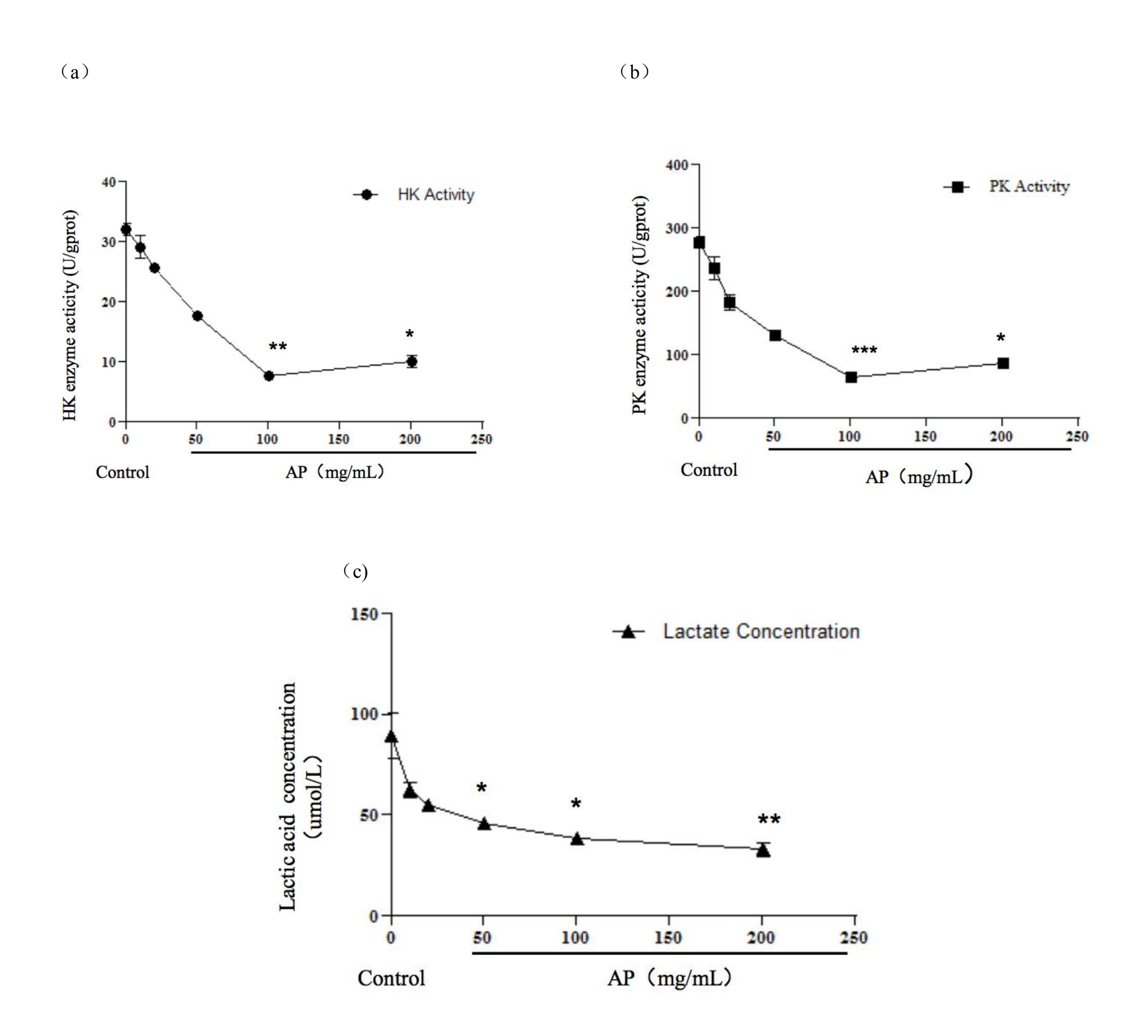


图 2.　海藻多糖对 Hep3B 细胞内源 HK 酶活力、PK 酶活力和乳酸含量的影响

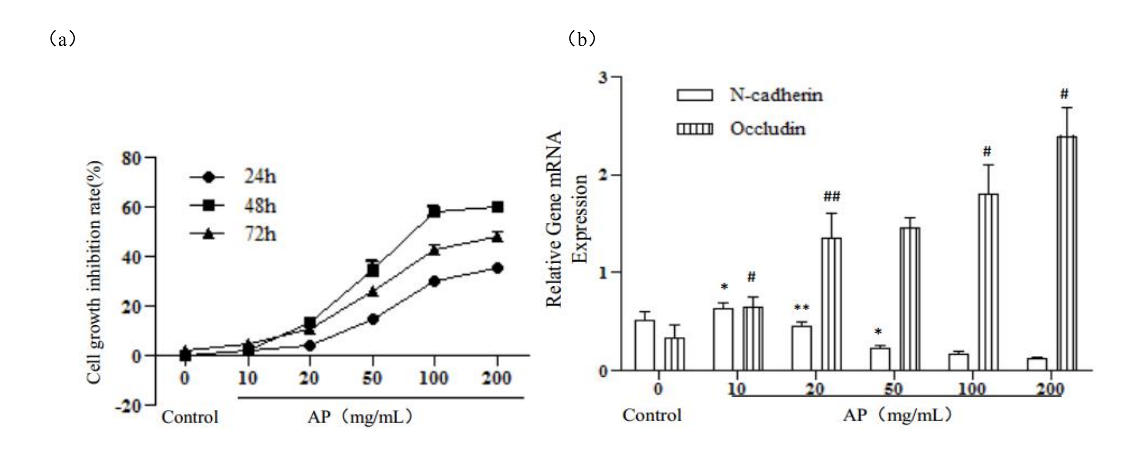
Fig.2　The effect of different concentration of Algal Polysaccharides(AP) on HK enzyme activity、PK enzyme activity and Lactic acid concentration in Hep3B cell

（a）:The protein level of HK and PK in the Hep3B cell treated with AP.　（b）: The viability of the Hep3B cell treated with AP.　（c）. The immigration of the Hep3B cell treated with AP.　Mean±SD. n=3. .*p<0.05 vs Control；**p<0.01 vs Control；***p<0.001 vs Control.

2.3　海藻多糖抑制肝癌细胞 Hep3B 的增值和迁移，且抑制 EMT 发生

不同浓度海藻多糖（10-200 mg/mL）分别处理 Hep3B 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后，细胞生长均得到抑制。处理 48 h，效果最显著。以 48 h 为例，随着海藻糖的浓度增加（10 mg/mL、20 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL、200 mg/mL），肝癌细胞增长抑制率显著升高,分别为(3.8±1.1%、15±2.1%、30±3.3%、56±3.9%、55±2.8%)，结果见图 3（a）。Transwell 小室实验结果显示，不同浓度海藻多糖（10-200mg/mL）处理 HepB3 细胞 48h 后，细胞迁移数均能得到抑制，与海藻糖浓度呈现依赖相关性（p<0.05）。海藻多糖浓度为 200 mg/mL 时，Hep3B 细胞迁移数为对照组 32±2.9%（p<0.01），见图 3（c）。利用 qPCR 进一步研究与细胞迁移密切相关的 EMT 途径标志蛋白：间充质标志物 N-cadherin，上皮细胞标志物 Occludin。N-cadherin 随着海藻多糖浓度的升高，mRNA 表达水平降低

（p<0.05），Occludin 则相反（p<0.05），说明 AP 能抑制 EMT 发生，见图 3（b）。



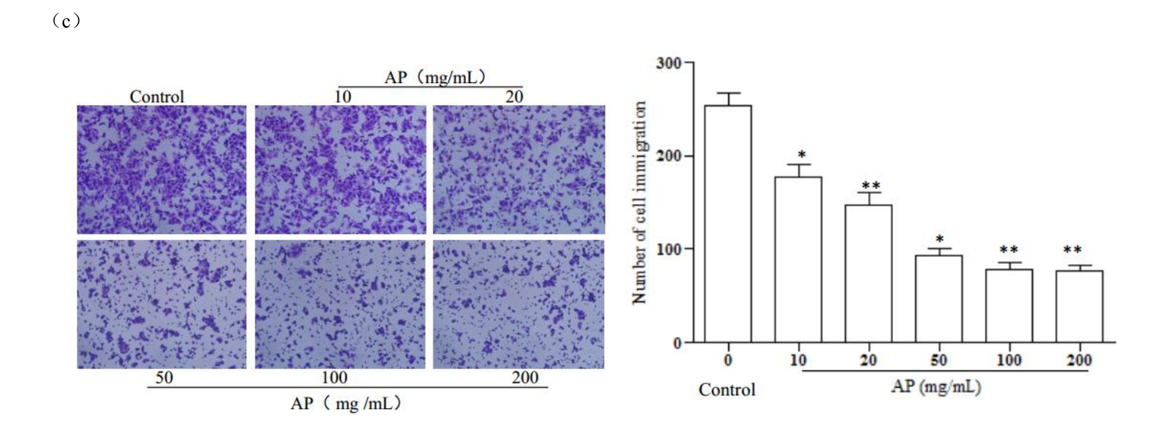


图 3 不同浓度海藻多糖对肝癌细胞 Hep3B 迁移、增殖及 EMT 的影响

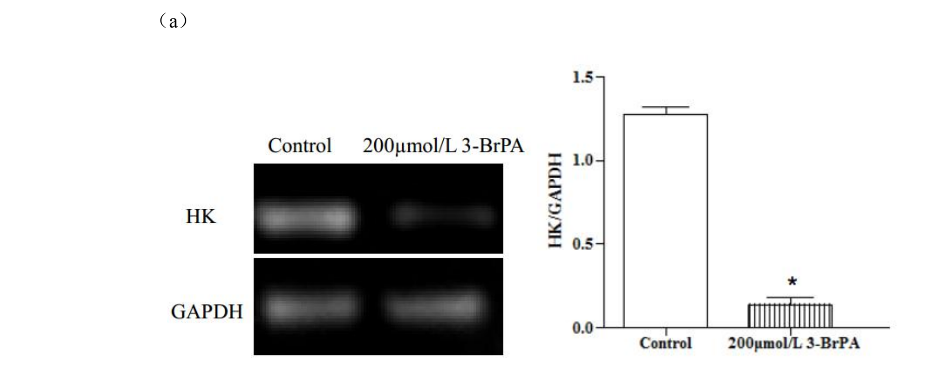
Fig.3 The effect of different concentration Algal Polysaccharides(AP) on migaration 、proliferation of Hep3B cell and EMT pathway

（a）: The Hep3B growth inhibition rate tested by MTT assay.]; （b） The relative gene mRNA expression of N-cadherin and Occludin after Algal Polysaccharides(AP) treatment tested using qPCR in Hep3B.; （c）: The immigration of the Hep3B cell treated with different concentration Algal Polysaccharides(AP) according to Transwell; **p<0.01 vs control; #p<0.05 vs Occludin Control;##p<0.01 vs Occludin Control.

2.4 已糖激酶抑制剂 3-BrPA 下调 Hep3B 细胞活力和迁移，且抑制 EMT 发生

3-溴丙酮酸是（3-BrPA）是二型已糖激酶（HK-II）抑制剂，基于可抑制 EMP 代谢水平，目前已作为一种新型抗肿瘤药物进入临床试验阶段[10]。Western Blot 结果显示，与对照组相比，3-BrPA（200μmol/L）处理组的 HK 表达明显下降（p<0.05）证明 3-BrPA 有效抑制 HK 表达，见图 4（a）。MTT 实验结果显示，3-BrPA(200μmol/L)处理组分别加药处理 Hep3B 细胞 24h，48h 和 72h 后，Hep3B 细胞活性与对照组相比分别下降了（19±4.7）%，（52±5.8）%和（31±5.9）%。差异有统计学意义（p<0.05，p<0.001，p<0.01）。表明降低 HK 活性能抑制 Hep3B 细胞活力，见图 4（b）。Transwell 小室迁移实验表明，与对照组相比，3-BrPA（200μmol/uL）处理组细胞迁移数下降了（48±6.1）%，差异具有统计学意义

（p<0.01），表明 3-BrPA 有效下调 HK 活性并且能抑制 Hep3B 细胞迁移能力，见图 4（d）。利用 qPCR 进一步研究与细胞迁移相关的 EMT 途径标志蛋白：间充质标志物 N-cadherin 上皮细胞标志物 Occludin。3-BrPA 处理组与对照组相比，N-cadherin mRNA 表达水平下降（p<0.01），Occludin 则相反（p<0.01），见图 4（c）。



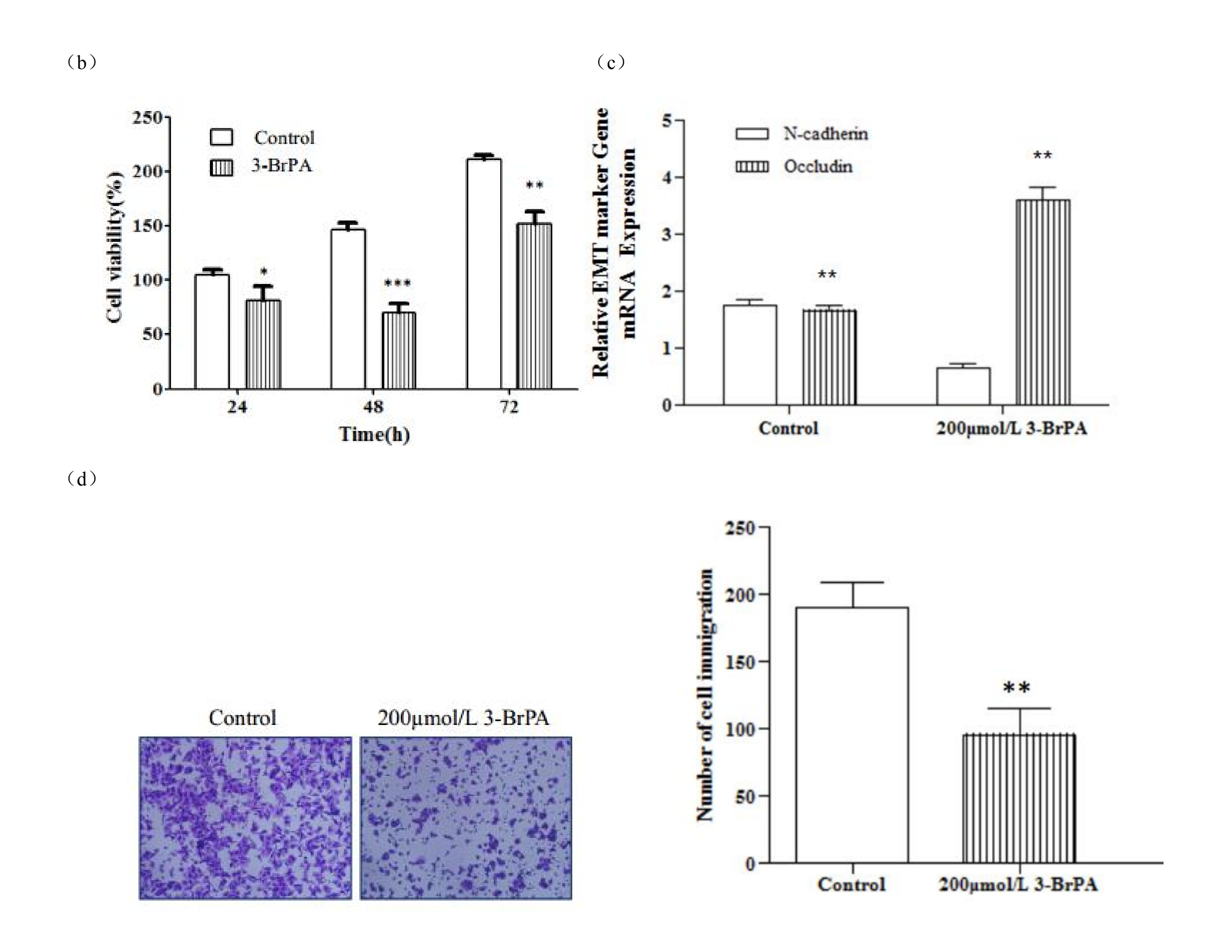


图 4. 已糖激酶抑制剂 3-BrPA 对 Hep3B 细胞活力、迁移作用和 EMT 的影响

Fig.4 The effect on viability、migration and EMT of the Hep3B cell treated with HK inhibitor 3-BrPA.

（a）:The protein level of HK in the Hep3B cell treated with 3-BrPA. （b）: The viability of the Hep3B cell treated with 3-BrPA. （c）The relative gene mRNA expression of EMT marker including N-cadherin and Occludin after 3-BrPA treatment tested using qPCR in Hep3B.;（d）. The immigration of the Hep3B cell treated with 3-BrPA. Mean±SD. n=3.*p<0.05 vs Control；**p<0.01 vs Control；

***$p<0.001$ vs Control.

2.5 海藻多糖和 3-BrPA 均下调糖酵解代谢水平，且抑制 Akt 信号通路

Western blot 结果显示，AP 或者 3-BrPA 分别处理 Hep3B 后，肝癌细胞 EMP 限速酶 HK 和 PK 活性，产物乳酸均下降，Hep3B 的 EMP 水平得到抑制，如图 5（b）。HK-II 蛋白和 p-Akt 表达水平较对照组均下降，且 Akt 蛋白水平没有发生变化，Akt 信号通路受到抑制，见图 5（a）。证明 AP 与 3-BrPA 药物类似，都能下调 EMP 代谢水平，且抑制 Akt 信号通路。

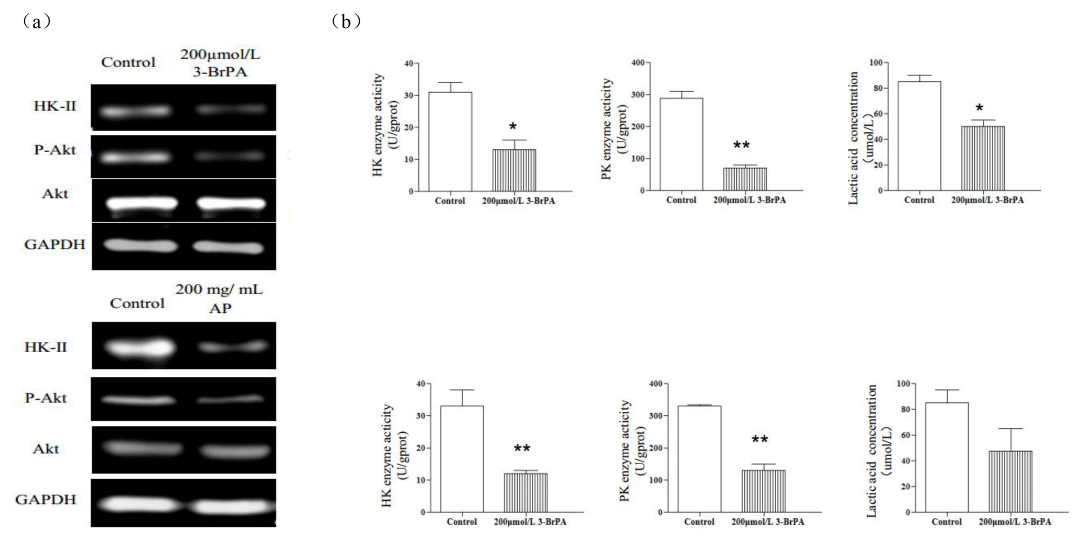


图 5. 海藻多糖与 3-BrPA 分别处理细胞时，对 EMP 代谢水平以及 Akt 通路的影响

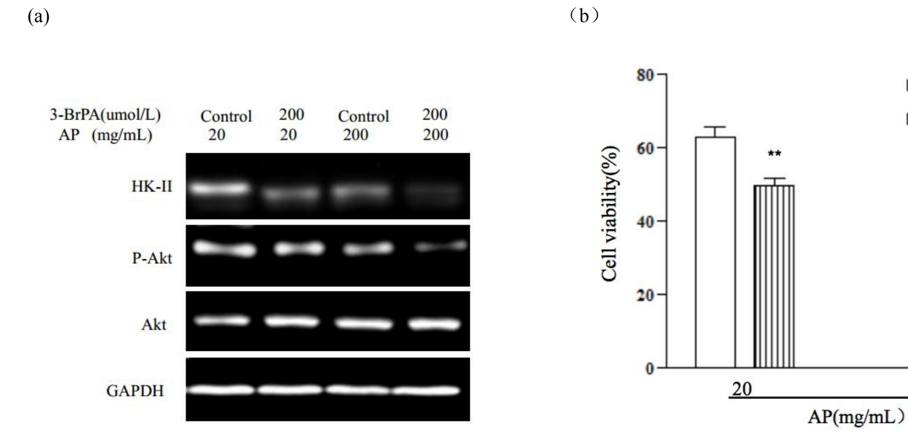
Fig.5 The effect of on the EMP Pathway and Akt signaling pathway in Hep3B cell with Algal Polysaccharides(AP) or 3-BrPA treatment

(a): The protein level of HK-II、p-Akt、Akt and GAPDH in the Hep3B cell treated with AP or 3-BrPA. (b): The EMP metabolic levels of the Hep3B cell treated with AP or 3-BrPA. Mean±SD. n=3. *$p<0.05$ vs Control；**$p<0.01$ vs Control；.

2.6 海藻多糖与 3-BrPA 联合应用后，进一步抑制细胞活力和迁移，且抑制 Akt 信号通路

Western Blot 结果显示，AP 与 3-BrPA 联合处理 Hep3B 后。HK 蛋白表达水平较 AP 单用组要低，当 3-BrPA 浓度为 200μmol/L，海藻多糖浓度为 200mg/mL 时，HK 表达水平最低（$p<0.01$），且显著抑制 p-Akt 表达，见图 6（a）。AP 与 3-BrPA 联合处理后，Hep3B 细胞的活性和迁移能力均较海藻糖单用组下降（$p<0.01$），见图 6（b）和图 6（c）。

(a) （b）



(c)

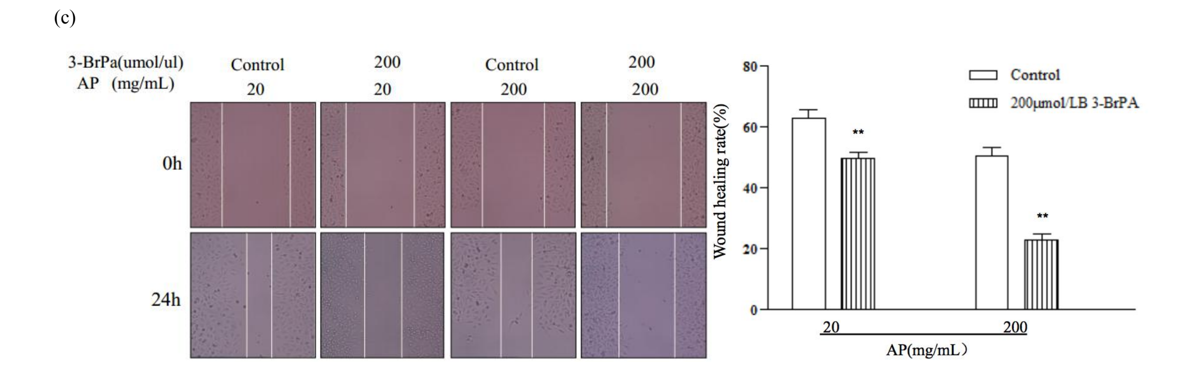


图 6. 海藻多糖与 3-BrPA 联合应用对 Hep3B 细胞活力，迁移及 Akt 信号通路的影响

The effect of Algal Polysaccharides(AP) and 3-BrPA co-treatment on the cell viability、cell migration and Akt signaling pathway in Hep3B cell

(a): The protein level of HK-II、Akt、p-Akt and GAPDH in the Hep3B cell treated with AP and 3-BrPA. (b): The viability of the Hep3B cell treated with AP and 3-BrPA. (c). The immigration of the Hep3B cell treated with AP and 3-BrPA. Mean±SD. n=3. *p<0.05 vs Control; **p<0.01 vs Control; ***p<0.001 vs Control.

3 讨论

肿瘤细胞作为一种代谢异常疾病，在缺氧环境中能利用 EMP 产生能量，能量代谢中大约 50%至 70%依赖的是 EMP。EMP 途经的三个重要限速酶分别是 HK，磷酸果糖激酶（PFK），PK。基于此，抑制 EMP 代谢水平也是临床药物开发的靶点[11] 。如葡萄糖转运体（Glut1）抑制剂：Phloretin、Quercetin、STF31 和 WZB117 等，靶向为 HK-II 的 3-BrPA、2-DG 和 Lonidamine 等，靶向为 PFK2 的 3PO 等，靶向为为 PK 的 TT-232 等[12]。本文实验结果表明，不同来源癌细胞 EMP 代谢水平均高于正常细胞 HK，尤其以肝癌细胞 Hep3B 最为显著，AP 抑制 EMP 代谢水平。因此，AP 能调节 EMP 代谢水平抑制 Hep3B 迁移和增殖具有可行性。

目前了解海藻多糖的功能有：增加机体免疫力、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗辐射等。它的抗肿瘤作用机制，主要认为与加强细胞免疫能力有关。它既可以激活 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、CTL 细胞、LAK 细胞等免疫细胞的活性[13]，还促进 IL 一 1、TNF、C3 等效应因子的生成，还能调节血象，抑制红细胞膜上 Na^{+}， K^{+}，- ATPase 活性，发挥强大的免疫网络功能，提高机体的整体抗肿瘤能力[14]。在本课题前期实验中结果表明，AP 可双向调节面包酵母菌株 (Saccharomyces cerevisiae BY-6)的单倍体菌株 9α 的 EMP 代谢水平。所以我们提出设想：AP 与 EMP 代谢水平在肿瘤细胞中是否存在调节关系，进而调节癌症细胞活动？本文实验结果首次证明，AP 能抑制肝癌 Hep3B 细胞 EMP 代谢水平，存在浓度依赖性。Hep3B 细胞活性和迁移率，随着 AP 浓度的上升而下降，也存在浓度依赖性。暗示新的 AP 抗肿瘤机制可能通过调节 EMP 代谢水平完成。基于 AP 对肝癌细胞迁移能力影响显著，我们检测了与细胞迁移密切相关的 EMT

标志物，EMT 是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。并发现，随着 AP 浓度提升，上皮标志物 Occludin mRNA 表达水平上升，间质标志物 N- Cadherin mRNA 表达水平下降。因此提示 AP 可抑制肝癌细胞 EMP 代谢水平，低 EMP 代谢水平通过抑制 EMT 发生，从而下调 Hep3B 的迁移能力。我们本次试验采用海藻多糖混合物，下一步将具体鉴定是哪一种海藻多糖发挥功效。

在上一步实验中，我们证实 AP 对 EMP 代谢水平起到抑制作用，且对癌细胞活性和迁移能力产生一定抑制效果。为了进一步研究 EMP 代谢水平下降是否可以直接抑制癌细胞的细胞活性和迁移能力。我们采用已知能调节癌症 EMP 水平的药物，3-BrPA。HK-II 抑制剂 3-BrPA 抑制 EMP 第一个限速酶的表达，3-BrPA 可以直接烷基化 HK-II 中的硫基使 HK-II 失活，从而下调 EMP 代谢水平[15]。目前 3-BrPA 作为抗癌药物已进入二期临床实验阶段。将 3-BrPA 作用于肝癌 Hep3B 细胞时，EMP 代谢水平降低，且伴随着肝癌细胞 Hep3B 细胞活性和迁移下降。因此提示，当癌症细胞中 EMP 水平发生变化时，会影响肿瘤发生的活动，如迁移和增殖。我们同时检测了与细胞迁移密切相关的 EMT 标志物，并发现，3-BrPA 处理组上皮标志物 Occludin mRNA 表达水平上升而间质标志物 N- Cadherin mRNA 表达水平下降。因此提示 3-BrPA 通过下调 HK 活性抑制 EMP 代谢水平，EMP 代谢水平的降低抑制 EMT 发生，从而导致 Hep3B 迁移能力下降。这与 AP 抑制 Hep3B 迁移和增殖可能机制类似。虽然肿瘤细胞需通过 EMP 获取能量，对 EMP 具有高度依赖性，但是只抑制 EMP 往往不能有效杀死肿瘤细胞，将机制不同的多种 ATP 耗竭联合是提高疗效的方式之一[16]。本文实验将海藻多糖和 3-BrPA 联用后，抑制细胞活性百分比和抑制细胞迁移率显著高于单用 AP 组。

PI3K/Akt 是细胞内重要的生存信号通路，关键分子是 Akt。研究表明，激活后的 Akt 在高糖酵解的癌细胞中起到很强的抗凋亡作用[17]。Akt 的持续性稳定表达能诱导 EMT 发生，使癌细胞的迁移能力增强[18]。因此，我们提出设想，PI3K/AKT 信号是否参与 AP 和 3-BrPA 介导下调 EMP 代谢水平，从而抑制肝癌细胞迁移。Western Blot 显示，AP 单独处理组和 3-BrPA 单独处理组，肝癌细胞 EMP 代谢水平下降，且伴随着 Akt 的磷酸化水平下降，总 Akt 水平保持不变。在 AP+3-BrPA 处理组中，Akt 的磷酸化水平显著下降。证明 AP 和 3-BrPA 介导下调 Hep3B 的 EMP 代谢水平，而低 EMP 代谢水平抑制 Hep3B 迁移和增殖能力的机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

总之，癌细胞中，糖酵解代谢水平高于正常细胞。海藻多糖能下调肝癌细胞 Hep3B 的 EMP 代谢水平，低 EMP 代谢水平可抑制细胞的增殖，细胞活力和迁移活动。而 EMP 低水平代谢抑制肝癌细胞活动的机制，可能与抑制 EMT 发生和 PI3K/Atk 信号通路相关。EMT 和 PI3K/Atk 信号通路对 EMP 低代谢水平时抑制癌细胞迁移能力和增殖能力，存在生物叠加效应还是触发其他信号通路还需进一步验证。本文为阐述 AP 新的抗肿瘤机制累计实验数据，也为治疗肝癌提供了潜在的的治疗方法和药物。

参考文献

[1] Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(1): 14-21.

[2] Lee J C, Hou M F, Huang H W, et al. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties[J]. Cancer Cell International, 2013, 13(1): 55.

[3] Kim J, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect[J]. Cancer research, 2006, 66(18): 8927-8930.

[4] Porporato P E, Dhup S, Dadhich R K, et al. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review[J]. Frontiers in pharmacology, 2011, 2.

[5] Altenberg B, Greulich K O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes[J]. Genomics, 2004, 84(6): 1014-1020.

[6] Gatenby R A, Gillies R J. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007, 39(7): 1358-1366.

[7] Heimbach J, Kulik L M, Finn R, et al. Aasld guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2017.

[8] Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2016, 150(4): 835-853.

[9] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy[J]. Immunity, 2014, 41(1): 49-61.

[10] Nilsson H, Lindgren D, Forsberg A M, et al. Primary clear cell renal carcinoma cells display minimal mitochondrial respiratory capacity resulting in pronounced sensitivity to glycolytic inhibition by 3-Bromopyruvate[J]. Cell death & disease, 2015, 6(1): e1585.

[11] Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, et al. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25677.

[12] Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J F H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects[J]. Molecular cancer, 2013, 12(1): 152.

[13] Costa L S, Fidelis G P, Cordeiro S L, et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2010, 64(1): 21-28.

[14] Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research[J]. Carbohydrate polymers, 2012, 90(4): 1395-1410.

[15] Shoshan M C. 3-Bromopyruvate: targets and outcomes[J]. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2012, 44(1): 7-15.

[16] Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review)[J]. Oncology letters, 2012, 4(6): 1151-1157.

[17] Liu Z, Zhang Y Y, Zhang Q W, et al. 3-Bromopyruvate induces apoptosis in breast cancer cells by downregulating Mcl-1 through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Anti-cancer drugs, 2014, 25(4): 447-455.

[18] Ha G H, Park J S, Breuer E K Y. TACC3 promotes epithelial–mesenchymal transition (EMT) through the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. Cancer letters, 2013, 332(1): 63-73.

Algal Polysaccharides Inhibits Proliferation and Migration of Liver Cancer Cell Hep3B via Down-regulation of EMP Pathway

FENG Yuan TANG Yun XU Lei

（Key laboratory of Functional Protein Research of Guangzhou Higher Education Institutes,

Institute of Life and Health Engineering，Jinan University，Guangzhou，510632，China）

Abstract **Objective:** To investigate the effort of Algal Polysaccharides(AP) on the ability of proliferation and migration in the liver cancer cell line Hep3B and potential mechanism which may provide a new idea for treatment of liver cancer.Methhods:1)Four different cell lines were selected to compare the metabolic levels of Embden-Meyerhof-Parnas(EMP) pathway in normal cells and cancer cells.2)To detect the EMP metabolic levels changes in Hep3B with AP treatment.3)MTT, qPCR and Transwell were used to measure the ability of cell proliferation ,EMT marker and cell migration respectively in Hep3B cell with AP treatment.4) Measured the ability of cell viability， proliferation and EMT Pathway with inhibitor: 3-Bromopyruvate（3-BrPA）. 5) Measured EMP levels and Akt signal Pathway changes with AP or 3-BrPA treatment. 6) Detected Akt signal pathway、cell viability and migration changes with AP and 3-BrPA treatment. **Result:** 1)The metabolic levels of EMP in cancer cells（Hep3B，Hela，SW480）are higher than normal cell（HL02）.Hep3B cell EMP metabolic level is the highest in three cancer cell lines. 2) AP down regulated metabolic levels in Hep3B cell and it was concentration-dependent. 3) AP inhibited the ability of proliferation and migration in Hep3B and down regulated the EMT progress. 4) 3-BrPA inhibited HK activity and down regulated the cell viability rate and migration ability compared with control group（$p<0.01$）. 5) AP and 3-BrPA both down regulated the EMP levels and inhibited Akt signal pathway. 6) In AP + 3-BrPA group, HK activity was depressed obviously compared with AP group, and cell viability and wound healing rate were decreased seriously. **Conclusion:** The metabolic level of EMP pathway in Hep3B is much higher than normal cell. AP could down regulated Hep3B cell EMP metabolism level. Low metabolism levels of EMP could inhibit the proliferation and migration of Hep3B via down-regulation of EMT progress and Akt signaling pathway. When Hep3B was co-treated with AP and 3-BrPA， the cell ability and migration ability were depressed more obviously than only AP treatment. These data show AP therapy was effective on liver cancer cell Hep3B.

Key words Algal Polysaccharides EMP Pathway HepB3 Cell Proliferation Cell Migration